

培養を介さないでも、 有用な遺伝子を微生物から取得できる新手法の開発

秦田 勇二¹, 飯塚 怜², 西 真郎³, 伊藤 芽¹, 関口 哲志⁴,
庄子 習一⁵, 船津 高志²

1 埼玉工業大学 工学部 生命環境化学科

2 東京大学大学院 薬学系研究科

3 国立研究開発法人海洋研究開発機構

4 早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構

5 早稲田大学 先進理工学研究科

hatada@sit.ac.jp

A new method for identification of microbial enzyme-encoding genes

Yuji Hatada¹, Ryo Iizuka², Shinro Nishi³, Mei Ito¹, Tetsushi Sekiguchi⁴, Shuichi Shoji⁵
and Takashi Funatsu²

1 Department of Life Science and Green Chemistry Faculty of Engineering, Saitama
Institute of Technology

2 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,

3 Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

4 Department of Nanoscience and Nanoengineering, Waseda University

5 Research Organization for Nano & Life Innovation, Waseda University,

Abstract

Environmental microbes were encapsulated in water-in-oil microdroplets with a fluorogenic substrate for the target enzyme to screen for microdroplets that contain microbially active cells. The genomes from the active cells were amplified and sequenced to identify the genes encoding target enzymes.

Environmental microbes are a great source of industrially valuable enzymes with potent and unique catalytic activities. Unfortunately, the majority of microbes remain unculturable and thus are not accessible by culture-based methods. Here we present a methodological approach for the identification of genes that encode metabolically active enzymes in environmental microbes in a culture-independent manner.

Key Words: industrially valuable enzyme, single-cell, gene, screening, microdroplet

1. 緒言

微生物は古くから醗酵食品（お酒，ヨーグルト，納豆など）をつくるためなどに利用されてきた。大村博士のノーベル賞にもみられるように抗生物質などの創薬リード化合物も微生物から多く発見されている。さらに今後は，二酸化炭素濃度向上が起因とされている地球温暖化問題からの解決策として，化石燃料（原油など）に代替する新エネルギーの開発分野に微生物の能力が大きく期待されている。

地球上の物質変換の主役は微生物である。地球上にはおよそ 300 万種類の微生物が存在すると推定されている。しかしこれまでにその正体が明らかになったものは僅か 1 % であり，残り 99 % はその能力を評価されていない未研究の微生物である。これらの微生物たちの中に，人々の暮らしをより豊かにするための”有用な微生物”が数多く眠っている。それでは，なぜ残り 99 % の微生物はその能力を評価されずに放って置かれているのか？

これまでの微生物の能力評価は，培養できる（つまり任意にその個数を増やすことができる）微生物だけを対象として進められてきた，従って，培養できないと判断されている微生物はその評価を後回しにされてきたことになる。微生物は一つ一つ，その種類によって増えることのできる条件に個性がある。従って，その個性をしっかりと理解すれば培養（任意にその個数を増やすこと）ができることになる。しかしながら，その個性を把握するために費やす時間と労力は甚大である。その作業を一種一種の微生物に対して施すとすると天文学的な時間を要することになる。

そもそも微生物の発揮する有用な能力を評価する際に，事前にその微生物個数を増やす必要があるのはどうしてなのか？その理由は，調べたい能力を評価（測定）するための測定感度が，微生物 1 個体のみの発揮する能力を判定するには低過ぎるためである。

そこで今回は微生物 1 個体が発揮する能力を評価できる水準まで測定感度を上げる工夫

を検討してみた。その中でも大きな工夫は次の 3 つである。

①マイクロドロップレットの利用

微生物の 1 個体の持つ能力を評価するために，微生物を（酵素反応基質とともに）1 個体毎に閉じ込めることのできるカプセルを用意する必要がある。今回は油液中に少量の水を混ぜて形成されるマイクロドロップレットをカプセルとして利用することとした。

②酵素反応後の生成物が蛍光物質である

一般的に，酵素反応速度を測定するには，酵素反応によって変換される物質（基質）と変換後に生じる物質（生成物）の反応前後での変化量を見比べることになる。今回は酵素反応の生成物として蛍光物質を生成する基質を選んだ。このことにより検出感度が飛躍的に向上する。

③微生物 1 個体から目的遺伝子の取得

微生物 1 個体が有するゲノム DNA を multiple displacement amplification (MDA) 法により充分に増幅した。さらにこの増幅 DNA を鋳型として目的の活性を有する酵素遺伝子を PCR 増幅し，新規な有用遺伝子を取得することとした。

自然環境に生息する微生物群を対象に目的の有用活性を有する遺伝子を探索することとした。二酸化炭素濃度の上昇による地球温暖化問題が浮上し，「脱化石燃料依存の社会形成」が求められている。これに向けて，非可食バイオマスであるセルロースを原材料としたバイオエタノール生産技術が世界中で研究されている。その中でバイオエタノール生産コストを抑えるために，優秀な β グルコシダーゼ酵素を開発することが大きな課題となっている。そこで今回は，取得を目指す有用遺伝子ターゲットとして β グルコシダーゼ遺伝子を選択した。

2. 材料および方法

マイクロドロップ法を用いた有用微生物のス

クリーニング

本法¹⁾の目的酵素活性を発揮する微生物のスクリーニングの流れを Figure 1 に示す。

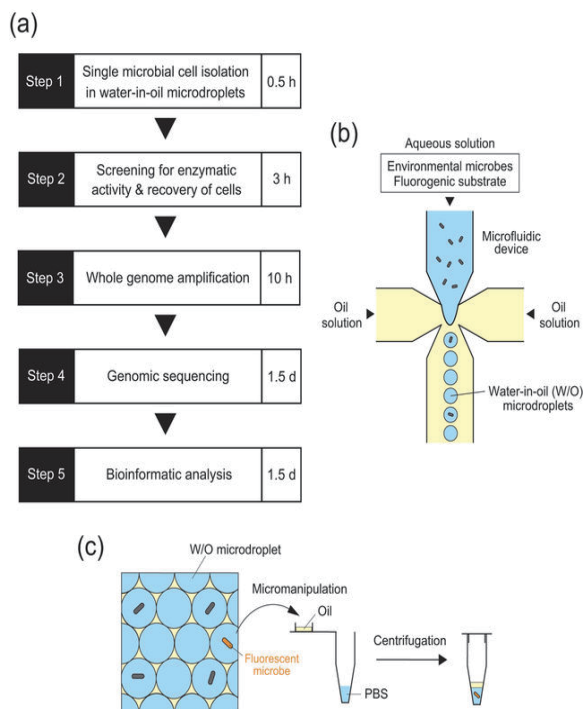


Figure 1, Schematic workflow for identifying microbial enzyme-encoding genes by activity-based single-cell sequencing using microdroplets.

(a) The workflow includes single microbial cell isolation in W/O microdroplets (step 1), activity-based single-cell screening and recovery of target cells (step 2), whole genome amplification (step 3) and genome sequencing (step 4). Genes encoding the target enzymes are identified based on genomic information (step 5). The entire process could be completed in 4–5 days.

(b) Schematic representation of single microbial cell isolation in W/O microdroplets using a microfluidic device.

(c) Schematic representation of activity-based single-cell screening and recovery of target cells.

※Figure 1 は Sci Rep. 2016; 6: 22259¹⁾ から引用

交差するマイクロ流路装置を用いてピコリ

ットルサイズのドロップレットを調製した。より具体的には, Figure 1(b)に示した通り, 縦方向には水溶液を横方向には脂溶性溶液を流し, 脂溶性溶液中に水溶液の水滴を生じさせた。水溶液中には酵素反応の基質と微生物群を混在させておいた。微生物濃度は1つのドロップレットに平均して1個体の微生物を含む水準まで希釈した。その後ドロップレット群を 30℃で保温して酵素反応を進めた。数時間後, ドロップレットを蛍光顕微鏡で観察した。酵素反応が進行したものは蛍光物質を生成するので光って見える (Figure 1(c))。ドロップレット群から, 蛍光によって光っている (微生物を含む) ドロップレットを回収した。エッペンドルフチューブに予め滅菌した食塩水 (0.8%) を入れておき, ここに回収したドロップレットを入れた。この際にドロップレットに付着していた脂溶性成分は上層に集まる (Figure 1(c))。下層 (水層) には目的活性を示した微生物が含まれる。今回は脂溶性成分としてミネラルオイル (シグマアルドリッチ社製) を用いた。

取得微生物からの有用遺伝子の取得

取得した微生物個体が保有するトータル DNA を phi29 DNA ポリメラーゼ²⁾ (キアゲン社製) を用いて増幅した (増幅 DNA がアガロース電気泳動で検出できる水準まで)。さらに DNA シークエンサー (イオン Torrent PGM : ライフテクノロジー製) によって, 上記の増幅したゲノム DNA 配列を解読した。続いて, バイオインフォマティクスの手法により, 解読したゲノム DNA 配列中から, 目的活性を持つ酵素をコードしていると推定される遺伝子配列から成る候補遺伝子を探し出した。続いて, 候補遺伝子を PCR で増幅し, プラスミドベクター DNA に連結して大腸菌に導入した。得られた大腸菌形質転換体の酵素活性を評価することで, 目的の活性を有する酵素をコードする遺伝子を探り当てた。

3. 結果と考察

β グルコシダーゼ活性を示す微生物の取得

マイクロドロップレット法によって、 β グルコシダーゼ活性を示す微生物が検出された結果を現すした写真を Figure 2 に示す。取得された微生物の 16SrRNA 配列 (微生物の分類を行う際に指標となる配列) を解析した結果、今回取得できた微生物は、これまでの研究報告では難培養性グループ (培養する方法が確立されていないグループ) に所属するものが多数見られた。従って、過去に評価されていない微生物をマイクロドロップレット法を用いることで初めて評価できたということを示す結果である。

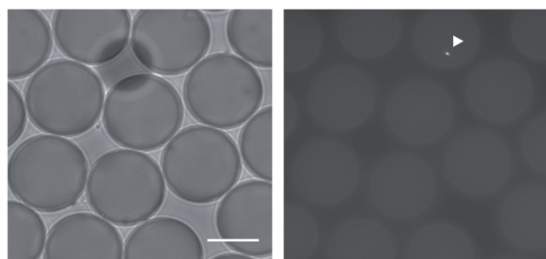


Figure 2, Detection of a microbe possessing beta-glucosidase activity.
Bright-field (left) and fluorescence (right) images of W/O microdroplets encapsulating environmental bacteria with fluorescent-glucose. The white arrowhead shows a fluorescent bacterial cell in a W/O microdroplet. Scale bar represents 20 μ m.

(※Figure 2 の一部は Sci Rep. 2016; 6: 22259¹⁾ から引用した)

新規 β グルコシダーゼ遺伝子の取得

マイクロドロップレット法によって取得された微生物 (β グルコシダーゼ活性を示したもの) のトータル DNA を MDA 法により増幅し、さらに DNA シークエンサーによって各々のトータル DNA 配列を解読した。続いて、バイオインフォマティクスの手法により、解読したゲノム DNA 配列中から、 β グルコシダーゼをコードする遺伝子配列 (候補遺伝子) を探し出した。さらに候補遺伝子を PCR で増幅し、プラスミドベクター DNA に連結後、大腸菌に導入した。得られた大腸菌形質転換体の β グルコシダーゼ活性を評価し、 β グルコシダーゼ遺伝子

が狙い通り、取得されていることを確認した。それらの推定アミノ酸配列と報告済みの β グルコシダーゼ酵素アミノ酸配列との相同性を調べた。その解析結果を Table 1 に示す。その中でも最も新規性の高いものは報告済み酵素とのアミノ酸配列の一致性が僅か 52% であり、新たな β グルコシダーゼ遺伝子が取得できていると判断された。今回の一連の実験で、新規性がとても高い酵素遺伝子が取得できた理由としては、これまでの研究報告では難培養性グループに所属するもの (培養できないと判断されている微生物) でもマイクロドロップレット法を用いることによって、新規酵素遺伝子探索の対象と成りえていることが第一に挙げられる。

Table 1, New beta-glucosidase (BGL) genes acquired by microdroplet method

	Accession number of the most similar sequences (their origin)	Identity (%)
BGL1	WP_015935647* (<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>)	56
BGL2	WP_028040971 (<i>Caulobacter</i> sp. URHA0033)	52
BGL3	WP_010381006 (<i>Pseudoalteromonas rubra</i>)	74
BGL4	WP_011044492 (<i>Colwellia psychrerythraea</i>)	63
BGL5	WP_019026132 (<i>Colwellia piezophila</i>)	67
BGL6	WP_010557357 (<i>Pseudoalteromonas marina</i>)	70
BGL7	KGJ93128 (<i>Colwellia psychrerythraea</i>)	72
BGL8	KGL60449 (<i>Polaribacter</i> sp. Hel1_33_49)	68

天然ポリマー分解微生物の探索に向けて

今回は酵素活性測定 of 検出感度を上げるために検出対象物質として蛍光物質を用いた。しかしながら、全ての酵素活性測定 (評価) 時に蛍光物質が利用できるわけではない。その例が天然ポリマー分解酵素活性測定の場合である。

非可食性の天然ポリマーを炭素源としてバイオエタノールあるいはバイオブタノールを生成する技術が求められている。しかしながら、天然ポリマーを均一に蛍光物質でラベルすることは難しい。もし天然ポリマーを微生物が分解する速度を測定する感度の高い方法が見出されれば、その方法をマイクロドロップレット法に引用することで天然ポリマー分解微生物

のスクリーニングが可能となると考えられる。

予備検討のためにまずは、培養法を用いて、天然ポリマーを分解できる微生物の探索を試みた。将来的には、天然ポリマーの分解活性を感度良く評価できる新たなドロップレット法の検討を進めるためのポジティブコントロールとして今回培養法で得られる天然ポリマー分解微生物を用いる。今回は分解対象の天然ポリマーとしてセルロース（セルラーゼ酵素により分解）とアガロース（アガラーゼ酵素³⁾により分解）、アルギン酸（アルギン酸リアーゼ酵素などにより分解）を選んだ。

天然ポリマー分解微生物の探索

アガロースは海藻（主に紅藻類）の細胞壁に存在する多糖であり、ガラクトースとアンヒドロガラクトースが交互に並んだユニークな構造をしている（Figure 3）。アガロースはお菓子づくりなどにも用いられる寒天の主成分である。紅藻類などの海藻（Figure 4）を分離源

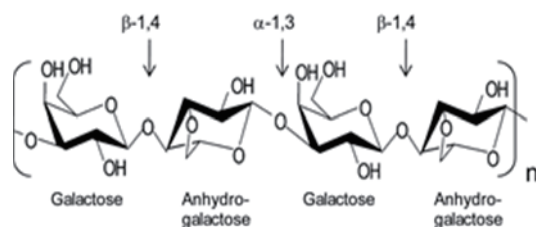


Figure 3, Structure of agarose



Figure 4, Sea weeds as screening source for agarase-producing bacteria.

として、集積培養法（アガロースを唯一の炭素源とした培地を用いた）によってアガロースを分解する微生物の取得を試みた。その結果、Figure 5（寒天で固めた培地に微生物を生育させた後、ヨウ素液を重層し、寒天を染色した。アガラーゼ生産菌であれば微生物の周辺は寒天中のアガロースが分解を受け、染色され難い状態になる）に示した通り、強いアガロース分解活性を示す微生物が数種類取得できた。



Figure 5, Degradation of agarose by an agarase-producing bacteria.

セルロースは、グルコースが β -1, 4-グルコシド結合をした多糖であり、植物体の細胞壁の主成分である。地球上で最も存在比率の高い天然ポリマーでもある。非可食性の天然ポリマーであることから、バイオエタノール生産のための原料として様々な研究がセルロースを対象として世界中で進められている。バイオエタノール生産のコストを下げるためには、強い活性を持ったセルロース分解酵素（セルラーゼ）が求められている。セルロース自体は水に不溶性であるため、本実験にはカルボキシメチル化したセルロースを酵素反応の基質として用いた。その結果、落ち葉が体積してできた土壌などから Figure 6 に示す通り、カルボキシメチルセルロース（CMC）の分解活性を示す微生物を数種類獲得できた。

アルギン酸は β -D-マンヌロン酸 と α -L-グルロン酸の 2 種（いずれもカルボキシル基をもつ単糖）が (1-4)-結合した直線状のポリマーである。アルギン酸はコンブなど海藻（褐藻類）に多く含まれる多糖である。アルギン酸もバイオエタノールの原材料となる多糖として期待されている。集積培養法（アルギン酸を唯一の

炭素源とした培地を用いた)によってアルギン酸を分解する微生物の取得を試みた。その結果, **Figure 7** (アルギン酸を含有した固体培地に微生物を生育させた後, 塩化セチルピリジニウム溶液を重層し, アルギン酸を染色した。アルギン酸分解酵素生産菌であれば微生物の周辺は固体培地中のアルギン酸が分解を受け, 染色され難い状態になる) に示した通り, 強いアルギン酸分解活性を示す微生物が数種類取得できた。

今後は今回培養法で得られた天然ポリマー分解微生物をポジティブコントロールとして用いることで, 蛍光物質を用いなくても天然ポリマーの分解活性が感度良く識別できるドロップレット法を構築するための検討を進めていく予定である。

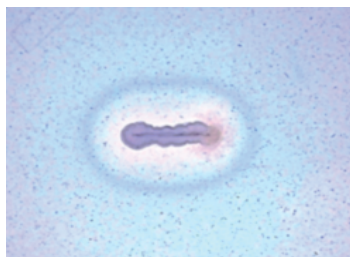


Figure 6, Degradation of CMC by a CMC-cellulase-producing bacteria.



Figure 7, Degradation of Alginate by an Alginate-producing bacteria.

4. 参考文献

1) K. Nakamura, R. Iizuka, S. Nishi, T. Yoshida, Y. Hatada, Y. Takaki, A. Iguchi, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, and T. Funatsu,

Culture-independent method for identification of microbial enzyme-encoding genes by activity-based single-cell sequencing using a water-in-oil microdroplet platform. *Sci Rep*, **6** (2016) 22259.

2) J. R. Nelson, Random-primed, Phi29 DNA polymerase-based whole genome amplification. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **105**, (2014) 15.13.1–15.13.16.

3) Y. Hatada, Y. Ohta and K. Horikoshi, Hyperproduction and application of alpha-agarase to enzymatic enhancement of antioxidant activity of porphyrin. *J Agric Food Chem* **27** (2006) 9895-9900.